

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

014108377

WPI Acc No: 2001-592589/*200167*

XRAM Acc No: C01-175831

Microbial preparation of polyhydroxyalkanoic acids, using new carbon sources useful as raw material for biodegradable plastics

Patent Assignee: CANON KK (CANO)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2001178484	A	20010703	JP 99371866	A	19991227	200167 B

Priority Applications (No Type Date): JP 99371866 A 19991227

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2001178484	A	10	C12P-007/62	

Abstract (Basic): *JP 2001178484* A

NOVELTY - Preparation of polyhydroxyalkanoic acids comprises culturing a

microorganism(s) growing by utilizing acetic acid or acetates and being capable of produce and accumulate the acids in a medium containing acetic acid or acetates as a single carbon source.

DETAILED DESCRIPTION - Preparation of polyhydroxyalkanoic acids comprises culturing a microorganism(s) growing by utilizing acetic acid or acetates and being capable of produce and accumulate the acids in a medium containing acetic acid or acetates as a single carbon source. Preferably, the method has a process of recovering the acids from the microorganism in the medium.

USE - Polyhydroxyalkanoic acids are useful as raw material for biodegradable plastics.

ADVANTAGE - The microbial method permits preparation of polyhydroxyalkanoic acids containing 6C, 8C, 10C, 12C and/or 14C units using acetic acid and acetates as a single carbon source.

pp; 10 DwgNo 0/0

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - ORGANIC CHEMISTRY - Preferred Compound: The acids contain one or more of units of formula (1-I) for polyhydroxyalkanoic acids.

R=CH₃-(CH₂)_{n-1}; and

n=3, 5, 7, 9 or 11.

Title Terms: MICROBE; PREPARATION; ACID; NEW; CARBON; SOURCE; USEFUL; RAW; MATERIAL; BIODEGRADABLE; PLASTICS

Derwent Class: A23; D16

International Patent Class (Main): C12P-007/62

International Patent Class (Additional): C12R-001-38; C12P-007/62

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C; A05-E02; A09-A07; D05-A04

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-178484
(P2001-178484A)

(43)公開日 平成13年7月3日(2001.7.3)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 7/62		(C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:38)		C 1 2 R 1:38)	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平11-371866

(22)出願日 平成11年12月27日(1999.12.27)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(72)発明者 本間 務

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(74)代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法

(57)【要約】

【課題】 糖、脂肪族炭化水素、脂肪酸、アルコール等の従来利用されてきた炭素源以外の炭素源を利用して、微生物に所望のポリヒドロキシアルカン酸を生産させる新規な方法の提供。

【解決手段】 酢酸またはその塩を単一炭素源として含む培地中で、酢酸またはその塩を資化することにより増殖し、かつポリヒドロキシアルカン酸を生産・蓄積する能力を有する微生物を培養することを特徴とするポリヒドロキシアルカン酸の製造方法である。

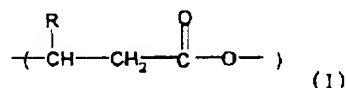
【特許請求の範囲】

【請求項1】 酢酸またはその塩を単一炭素源として含む培地中で、

酢酸またはその塩を資化することにより増殖し、かつポリヒドロキシアルカン酸を生産・蓄積する能力を有する微生物を培養することを特徴とするポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項2】 ポリヒドロキシアルカン酸は、下記式(1)・

【化1】



(式中、Rは CH_3 ・ $(\text{CH}_2)_{n-1}$ を示し、但し、 $n=3, 5, 7, 9, 11$)に示すヒドロキシアルカン酸のユニットを少なくとも一種類含有するポリヒドロキシアルカン酸であることを特徴とする請求項1に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項3】 酢酸またはその塩を単一炭素源として増殖し、かつポリヒドロキシアルカン酸を生産する能力を有する微生物が、シュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する細菌であることを特徴とする請求項1または2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項4】 シュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する細菌として、シュードモナス チコリアイ YN2株(*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM P-17411)、シュードモナス チコリアイ H45株(*Pseudomonas cichorii* H45; FERM P-17410)、シュードモナス ジェッセニイ P161株(*Pseudomonas jessenii* P161; FERM P-17445)のいずれかの菌株を選択することを特徴とする請求項3に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項5】 さらに、前記培地中の微生物からポリヒドロキシアルカン酸を回収する工程を設けることを特徴とする請求項1に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物を利用して、ポリヒドロキシアルカン酸を製造する方法に関する。特に、ポリヒドロキシアルカン酸の構成単位に3-ヒドロキシアルカン酸を含むポリヒドロキシアルカン酸を微生物を利用して製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】長年にわたって、石油由来の合成高分子を、プラスチック等として利用してきたが、使用後廃棄されるこれらプラスチック等の処理が大きな社会問題となっている。石油由来の合成高分子材料は、分解されにくい利点から、過去において、金属材料、ガラス等の代替えを果たしてきたが、大量に消費され、また大量に廃

棄される昨今では、その分解されにくいという性質が逆に災いし、廃棄物処理場に蓄積されることとなった。また、焼却処理を行うと、 CO_2 排出量の増加となり、ある場合には、ダイオキシンや環境ホルモン等の有害物質の発生原因ともなる。一方、ポリ3-ヒドロキシ酪酸(PHB)に代表される微生物産生ポリエステルは、石油由来の合成高分子とは異なり、生物により分解されうるという特性を有している。従って、廃棄した際、微生物産生ポリエステルは生分解されることにより自然界の物質循環に取り込まれるので、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することができる。加えて、微生物産生ポリエステルは、今後有用視される利用可能性として、医療用軟質部材としての応用が検討されている(特開平5-159号公報)。

【0003】これまで、多くの細菌が、PHBならびにその他のヒドロキシアルカン酸とのコポリマーを菌体内に生成・蓄積することが報告されている(「生分解性プラスチックハンドブック」(生分解性プラスチック研究会編; (株)エヌ・ティー・エス)、p178-197)。特に、アルカリゲネス・ユウトロファス H16株(*Alcaligenes eutrophus* H16, ATCC No. 17699)およびその変異株は、これらポリマーの生産に関し詳細に研究されている。この菌やその変異株は、基質となる炭素源を変化させることによって、3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)の共重合体、または両者の各単位を共に含有成分とする共重合体を様々な割合で生成することが開示されている(特公平6-15604号公報、特公平7-14352号公報、特公平8-19227号公報等)。

【0004】これ以外にも、種々の炭素源を利用して、ヒドロキシアルカン酸を構成単位に含むポリエステルなどを微生物に生産させる事例として、下記のものを挙げることができる。

【0005】特許第2642937号公報には、シュードモナス・オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC29347株に、炭素源として非環状脂肪族炭化水素を与えることにより、炭素数が6から12までの3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)をモノマーユニットとするポリエステルを生産することが開示されている。特開平5-74492号公報には、メチロバクテリウム(*Methylobacterium*)属、パラコッカス(*Paracoccus*)属、アルカリゲネス属、シュードモナス属のバクテリアを、炭素数3から7の第一級アルコールに接触させることにより3HBと3HVの共重合ポリエステルを生産せしめる方法が開示されている。

【0006】特開平5-93049号公報、ならびに特開平7-265065号公報には、アエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)をオレイン酸やオリーブオイルを炭素源として培養することにより、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)の2成分共重合ポリエス

テルを生産することが開示されている。

【0007】特開平9-191893号公報には、コマンナス・アシドボランス(*Comamonas acidovorans*) [F013 852株が、炭素源としてグルコン酸および1, 4-ブタンジオールを用いた培養により、3HBと4-ヒドロキシ酪酸(4HB)をモノマーユニットに持つポリエステルを生産することが開示されている。

【0008】上記の例は、ヒドロキシアリカン酸を構成単位に含むポリエステルを微生物に生産させる際、炭素源に糖、脂肪族炭化水素、脂肪酸、アルコールなどを利用した事例である。一方、ヒドロキシアリカン酸を構成単位に含むポリエステル、特にPHAを微生物に生産させる際、微生物の培養、生育、増殖に際し、酢酸またはその塩を含有する培地を利用した事例もあり、このような従来の事例としては以下のものが挙げられる。

【0009】特公平4-012712号公報、特公平4-012713号公報、特公平8-019227号公報、特許第2770378号掲載公報、特開平5-007492号公報においては、酢酸塩等を含む培地中で微生物を培養し、3HBと3HVの共重合体を生産する方法が開示されている。

【0010】特公平7-014352号公報、特公平7-014353号公報、特公平7-014354号公報、特開平5-023189号公報、特開平5-064591号公報、特開平6-181784号公報、特開平8-089264号公報には、3HBと4HB共重合体を微生物により生産せしめる方法において、生産を行わせる前に、予め、該微生物を増殖せしめる段階(前段培養あるいは増殖培養)では、酢酸またはその塩を使用することが可能であることが開示されている。

【0011】特公昭63-032438号公報、特公平2-020238号公報、特開平5-093049号公報では、酢酸塩等を含む培地中で微生物を培養し、培養した微生物を用いて、3HBホモポリマーを生産する方法が開示されている。

【0012】特公平7-103230号公報、特開平5-214081号公報には、3HB、4HB、及び3HVの共重合体を微生物により生産せしめる方法において、該微生物を増殖せしめる段階(前段培養あるいは増殖培養)では、酢酸またはその塩を使用することが可能であることが開示されている。

【0013】特公平7-113055号公報、特開平6-009761号公報では、3HB、4HB、3HV、及び3-ヒドロキシ吉草酸(5HV)の共重合体を微生物により生産せしめる方法において、該微生物を増殖せしめる段階(前段培養あるいは増殖培養)では、酢酸またはその塩を使用することが可能であることが開示されている。

【0014】特開平6-022773号公報、特開平6-038739号公報では、3HV、3-ヒドロキシオ

クタン酸(3HO)、及び3-ヒドロキシデカン酸(3HD)の共重合体を微生物により生産せしめる方法において、該微生物を増殖せしめる段階(前段培養あるいは増殖培養)では、酢酸またはその塩を使用することが可能であることが開示されている。

【0015】特開平6-145311号公報には、酢酸塩等を含む培地中で微生物を培養し、その微生物を利用してHB及び3-ヒドロキシプロピオン酸(3HP)の共重合体を生産する方法が開示されている。

【0016】特開平6-284892号公報にも、酢酸塩等を含む培地中で微生物を培養し、その微生物を利用して3HB、3HP、及び3HV共重合体を生産する方法が開示されている。

【0017】特開平6-062875号公報には、活性汚泥による非曝気状態でのPHA生産に、酢酸またはその塩が使用可能であることが開示されている。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】上述するように、従来、微生物生産ポリエステルであるポリヒドロキシアリカン酸(PHA)を生産せしめる場合の炭素源として、糖、脂肪族炭化水素、脂肪酸、アルコール等が利用されてきた。より広範囲な条件においてPHAを生産せしめるという観点から、これら従来利用されてきた炭素源以外に、ポリヒドロキシアリカン酸(PHA)の生産に用いることができる炭素源の範囲を広げることは重要となってくる。

【0019】本発明は、前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、糖、脂肪族炭化水素、脂肪酸、アルコール等の従来利用されてきた炭素源以外の炭素源を利用して、微生物に所望のポリヒドロキシアリカン酸(PHA)を生産させる新規な方法を提供することにある。より具体的には、前記炭素源は、微生物の培養・増殖に際しても利用され、培養・増殖と所望のポリヒドロキシアリカン酸(PHA)生産を同じ培地で達成可能な新規な方法を提供することにある。

【0020】

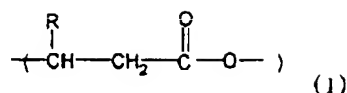
【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決すべく、鋭意研究・検討を進めた結果、酢酸またはその塩は、微生物の増殖を図る際に利用できるのみならず、ポリヒドロキシアリカン酸(PHA)を生産させる際の炭素源にも利用できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0021】すなわち、本発明の製造方法は、酢酸またはその塩を単一炭素源として含む培地中で、酢酸またはその塩を資化することにより増殖し、かつポリヒドロキシアリカン酸を生産・蓄積する能力を有する微生物を培養することを特徴とするポリヒドロキシアリカン酸の製造方法である。

【0022】例えば、前記ポリヒドロキシアリカン酸は、下記化学式(I)：

【0023】

【化2】



(式中、Rは $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{n-1}$ を示し、但し、 $n = 3, 5, 7, 9, 11$)に示すヒドロキシアルカン酸のユニットを少なくとも一種類含有するポリヒドロキシアルカン酸であることを特徴とするPHAの生産する方法とすることができる。本発明の製造方法において利用する微生物は、酢酸またはその塩を単一炭素源として増殖し、かつPHAを生産する能力を有する微生物であるが、好ましくは、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する菌を利用するとよい。より好ましくは、シュードモナス チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM P-17411)、シュードモナス チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45; FERM P-17410)、シュードモナス ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161; FERM P-17445)のいずれかの菌株を選択するとよい。

【0024】さらには、上記の本発明の製造方法は、前記培地中の微生物からポリヒドロキシアルカン酸を回収する工程を設けることを特徴とする製造方法とすることができる。

YN2株の菌学的性質

培養温度	: 30°C
細胞形態	: 桿菌(0.8×1.5~2.0 μm)
グラム染色	: 陰性
孢子形成	: 陰性
運動性	: 陽性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、光沢、半透明
カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 非発酵性
硝酸還元	: 陰性
インドール産生	: 陽性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β-ガラクトシダーゼ	: 陰性
基質資化能	
ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陰性
D-マンニトール	: 陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陰性
マルトース	: 陰性

【0025】

【発明の実施の形態】本発明のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法は、酢酸またはその塩を単一炭素源として増殖することができ、また、酢酸またはその塩以外の炭素源を含有しない培地において、ポリヒドロキシアルカン酸を生産する微生物を利用して、前記微生物を酢酸またはその塩を単一炭素源として含む培地中で、増殖させるとともに、目的のポリヒドロキシアルカン酸を生産させるものである。利用する微生物として、前記の特性を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する菌を用いると、例えば、上記一般式(1)に示す3-ヒドロキシアルカン酸のユニットを含むPHAの生産を高い効率で行えるものである。

【0026】加えて、上記の三種の菌株、シュードモナス チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM P-17411)、シュードモナス チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45; FERM P-17410)、シュードモナス ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161; FERM P-17445)は、いずれも好ましい菌株として、新規に分離された菌である。各菌株の菌学的性質を、以下に記載する。

【0027】以下に各菌株の菌学的性質を記載する。

【0028】

グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d-リシンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

King'sB寒天での蛍光色産生 : 陽性

4%NaClでの生育 : 陽性(弱)

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の蓄積 : 陰性(*)

Tween80の加水分解 : 陽性

* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

H45株の菌学的性質

培養温度	: 30℃
細胞形態	: 桿菌(0.8×1.0~1.2 μm)
グラム染色	: 陰性
胞子形成	: 陰性
運動性	: 陽性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、 表面なめらか、光沢、クリーム
カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 非発酵性
硝酸還元	: 陰性
インドール産生	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β-ガラクトシダーゼ	: 陰性
基質資化能	

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陰性
D-マンノース	: 陽性
D-マンニトール	: 陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陽性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d-リシンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

King'sB寒天での蛍光色産生 : 陽性

4%NaClでの生育 : 陰性

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の蓄積 : 陰性(*)

* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

P161株の菌学的性質

培養温度	: 30℃
細胞形態	: 多形態

	球状($\phi 0.6 \mu\text{m}$)
	桿状($0.6 \times 1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$)
	伸長型
グラム染色	: 陰性
胞子形成	: 陰性
運動性	: 陽性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、淡黄
カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 非発酵性
硝酸還元	: 陽性
インドール産生	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンシヒトロラーゼ	: 陽性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β -ガラクトシダーゼ	: 陰性
基質資化能	
ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陽性
D-マンニトール	: 陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陽性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
D-カプリン酸	: 陽性
アシピン酸	: 陰性
d1-リンコ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性
King'sB寒天での蛍光色産生	: 陽性

以上のような菌学的性質に基づき、バージェーズ・マニユアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー・第1巻(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume1)(1984年)及びバージェーズ・マニユアル・オブ・ディタミネーティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第9版(1994年)を参照して、属種の同定を行ったところ、YN2株及びH45株は、ともにシュードモナス・チコリアイ(*Pseudomonas cichorii*)と同定するのが適当と判断された。

【0029】一方、P161株に関しては、上記の菌学的性質の評価結果のみからは、最も類似性が高い属種として、シュードモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas fluorescens*)が選択されたが、その菌学的性質から分類学上の位置を確定するには至らなかった。そこで、遺伝的性質からの分類を試みるために、P161株の16S rRNAの塩基配列を決定し(配列番号: 1、cDNA

to rRNA)、公知のシュードモナス属微生物の16S rRNAの塩基配列との相同性を調べた。その結果、P161株とシュードモナス・ジェッセニイ(*Pseudomonas jessenii*)との間で、塩基配列の相同性が極めて高いことが判明した。さらに、System. Appl. Microbiol., 20, 137-149 (1997)、及び、System. Appl. Microbiol., 22, 45-58 (1999)に記載されたシュードモナス・ジェッセニイの菌学的性質と、P161株の菌学的性質との間で高い類似性も認められた。以上の結果から、P161株はシュードモナス・ジェッセニイに属せしめるのが妥当と判断された。

【0030】上記2種類の属種に同定されたいかなる菌株においても、これまでPHAの生産に関する報告例がないため、これらの菌株を新菌株であると判断し、通産省工業技術院 生命工学工業技術研究所に寄託した(YN2株: FERM P-17411、H45株: FERM P-17410、P161株: FERM P-1

7445)。

【0031】本発明のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法においては、前記YN2株、H45株、P161株に加えて、シュードモナス属に属し、酢酸またはその塩を単一炭素源として増殖することができ、また、ポリヒドロキシアルカン酸を生産する微生物を一般に利用することもできる。例えば、シュードモナス・オレオボランスも利用することが可能である。また、シュードモナス属に属する微生物に加えて、アエロモナス (*Aeromonas*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属などに属し、酢酸またはその塩を単一炭素源として増殖することができ、また、ポリヒドロキシアルカン酸を生産する微生物を用いることも可能である。

【0032】本発明の製造方法で用いる培地としては、リン酸塩及びアンモニウム塩または硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地組成に、炭素源として、酢酸または酢酸塩を添加してなる組成を有するものならば、いかなる培地でも良い。なお、培地に含まれる窒素源の濃度を調節することで、PHAの生産性を向上せしめることが可能である。添加する酢酸または酢酸塩の濃度は、0.1%～1.0% (w/v) 程度の範囲に選択するのが適当である。なお、酢酸をフリーの酸のまま添加する場合は、培地中のpHを中性付近に調整するとよい。

【0033】無機塩培地の一例として、本発明の一態様を示す実施例において用いた培地の組成を以下に示す(以下1/10N-M9培地と記載する)。

Na_2HPO_4 : 6.3
 KH_2PO_4 : 3.0
 NH_4Cl : 0.1
 NaCl : 0.5 g/L、pH=7.0

更に、良好な増殖およびPHAの生産のためには、前記組成の1/10N-M9培地に、以下に示す微量成分溶液を0.3% (v/v) 程度添加すると好ましい。

【0034】微量成分溶液

ニトリロ 三酢酸 : 1.5 ; MgSO_4 : 3.0 ; MnSO_4 : 0.5
 NaCl : 1.0 ; FeSO_4 : 0.1 ; CaCl_2 : 0.1 ; CoCl_2 : 0.1 ; ZnSO_4 : 0.1 ; CuSO_4 : 0.1 ; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 0.1
 H_3BO_3 : 0.1 ; Na_2MoO_4 : 0.1 ; NiCl_2 : 0.1

g/L

本発明の製造方法において、培養温度は、利用する微生物が良好に増殖可能な温度範囲に選択するとよい。例えば、上記の3種の菌株では、その菌学的性質に示す培養温度から、良好に増殖可能な温度範囲として、20℃～30℃程度の範囲に選択すると適当である。また、培養方法は、バッチ式、流動バッチ式、連続培養、リアクター形式等、通常の微生物の培養に用いられる方法をも用いることができる。

【0035】本発明の製造方法において、菌体から目的生産物PHAの回収は、通常行われているクロロホルム抽出が最も簡便な方法である。この有機溶媒を用いる抽

出法以外にも、有機溶媒を用いず、例えば、SDS等の界面活性剤処理、リゾチム等の酵素処理、EDTA、次亜塩素酸ナトリウム、アンモニア等の薬剤処理によってPHA以外の菌体内成分を除去することによって、PHAのみを回収する方法を採ることもできる。

【0036】

【実施例】以下に、具体例を示し、本発明の製造方法をより詳しく説明する。これらの具体例は、本発明における最良の態様の一例であるが、本発明は以下の具体例によってなんら限定されるものではない。

【0037】(実施例1)

TY2株を用いた酢酸ナトリウム単一炭素源培養によるPHAの生産

酢酸ナトリウム0.1%を含む1/10N-M9寒天培地上のシュードモナスチコリアイ YN2株のコロニーを、酢酸ナトリウム0.3%を含む1/10N-M9液体培地200 mLに植菌し、30℃で培養した。68時間後、遠心分離によって菌体を集菌した。

【0038】集菌したYN2株の菌体ベレットを凍結乾燥したところ、90 mgであった。この凍結乾燥ベレットを100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で24時間攪拌抽出した。抽出液をろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中に注ぎ、再沈殿させて、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、38 mgであった。回収したポリマーの、乾燥菌体当たりの量比は約4.2%となる。

【0039】得られたポリマーの組成は、以下の手順で分析した。

【0040】すなわち、ポリマー10 mgを25 mL容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解した。この液に、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、水2 mLを加えて激しく10分間振とうした後、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した。この試料を、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS; 島津QP-5050、DB-WAXキャピラリーカラム(J&W))にかけて、含まれる各ヒドロキシアルカン酸メチルのピークを同定した。表1に、分析結果をまとめて示す。

【0041】(実施例2)

H45株を用いた酢酸ナトリウム単一炭素源培養によるPHAの生産

酢酸ナトリウム0.1%を含む1/10N-M9寒天培地上のシュードモナスチコリアイ H45株のコロニーを、酢酸ナトリウム0.3%を含む1/10N-M9液体培地200 mLに植菌し、30℃で培養した。68時間後、遠心分離によって菌体を集菌した。

【0042】集菌したH45株の菌体ベレットを凍結乾

燥したところ、50 mgであった。この凍結乾燥ベレットを100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で24時間攪拌抽出した。抽出液をろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中に注ぎ、再沈殿させて、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、13 mgであった。回収したポリマーの、乾燥菌体当たりの量比は約26%となる。

【0043】得られたポリマーの組成は、上記実施例1に示す手順で分析した。

【0044】すなわち、ポリマー10 mgを25 mL容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解した。この液に、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、水2 mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した。この試料を、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS; 島津QP-5050、DB-WAXキャピラリカラム(J&W))にかけて、含まれる各ヒドロキシアルカン酸メチルのピークを同定した。表1に、分析結果をまとめて示す。

【0045】(実施例3)

P161株を用いた酢酸ナトリウム単一炭素源培養によるPHAの生産

酢酸ナトリウム0.1%を含む1/10N-M9寒天培地上のシュードモナスジェッセニー P161株のコロニーを、酢酸ナトリウム0.3%を含む1/10N-M

9液体培地200 mLに接種し、30℃で培養した。68時間後、遠心分離によって菌体を集菌した。

【0046】集菌したP161株の菌体ベレットを凍結乾燥したところ、50 mgであった。この凍結乾燥ベレットを100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で24時間攪拌抽出した。抽出液をろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中に注ぎ、再沈殿させて、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、11 mgであった。回収したポリマーの、乾燥菌体当たりの量比は約22%となる。

【0047】得られたポリマーの組成は、上記実施例1に示す手順で分析した。

【0048】すなわち、ポリマー10 mgを25 mL容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解した。この液に、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、水2 mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した。この試料を、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS; 島津QP-5050、DB-WAXキャピラリカラム(J&W))にかけて、含まれる各ヒドロキシアルカン酸メチルのピークを同定した。表1に、分析結果をまとめて示す。

【0049】

【表1】

各菌株の生産したPHAのモノマーユニットとGC-MSエリア比

	C4	C6	C8	C10	C12	C12'	C14
実施例1 (YN2株)	32.0	1.9	9.0	28.7	11.0	14.8	2.5
実施例2 (H45株)	—	1.5	17.6	48.2	10.8	16.3	1.8
実施例3 (P161株)	1.1	1.7	19.3	44.9	12.0	18.9	1.9

値は、GC-MSのピークエリア比(%)を示す。

各ヒドロキシアルカン酸ユニットの説明:

C4: 3-ヒドロキシ酪酸、

C6: 3-ヒドロキシヘキサン酸、

C8: 3-ヒドロキシオクタン酸、

C10: 3-ヒドロキシデカン酸、

C12: 3-ヒドロキシドデカン酸、

C12': 未同定。3-ヒドロキシドデカン酸に不飽和部分或いは分岐部分が含まれる化合物であると推定される。

C14: 3-ヒドロキシテトラデカン酸表1に示す分析結果から、酢酸またはその塩を単一炭素源として添加する無機塩培地において、実施例1のTY2株、実施例2のH45株、実施例3のP161株のいずれも、増殖し、その菌体内にポリヒドロキシアルカン酸を生産・蓄

積していることが確認される。また、そのポリヒドロキシアルカン酸は、少なくとも、3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)、3-ヒドロキシオクタン酸(3HO)、3-ヒドロキシデカン酸、3-ヒドロキシドデカン酸、3-ヒドロキシテトラデカン酸のユニット種類を含むことを示している。これら炭素数6、8、10、12、14の3-ヒドロキシアルカン酸のユニットは、上述の一般式(1)に示すものとして、菌体から回収されたポリヒドロキシアルカン酸に含まれている。

【0050】

【発明の効果】本発明のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法により、酢酸またはその塩を単一炭素源として、ポリヒドロキシアルカン酸、特に、C6、C8、C10、C12、C14ユニットを少なくとも一種類含むポリヒドロキシアルカン酸を微生物を用いて製造すること

が可能となった。

【0051】

【配列表】SEQUENCE LISTING

<110>: CANON INC.

<120>: Preparation of Poly-hydroxyalkanoic Acid

<130>: 4047062

<160>: 1

<170>: Microsoft Word

<210>: 1

<211>: 1501

<212>: DNA

<213>: Pseudomonas jessenii P161 ; FERM P-17445

<400>: 1

```

tgaacgtcg cgagcgcct aacacatgca agtcgagcgg 40
atgacgggag ctgtctctg aattcagcgg cgacgggtg 80
agtaatgctt aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt 120
ctcgaaaggg acgctaatac cgcatacgtc ctacgggaga 160
aagcagggga ccttcgggcc ttgcctatc agatgagcct 200
agstcgattt agctagttag tgaggtaatg gctaccaag 240
gcagcatccc gtaactggtc tgagagatg atcagtcaca 280
ctggaactga gacacggctc agactctac gggagcgagc 320
agtggggaat attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc 360
catgcgcgtg gtgtgaagaa ggtcttcgga ttgtaaagca 400
ctttaaattg ggaggagggt cattaacctt atacgttagt 440
gttttgacgt taccgacaga ataagcaccg gctaactctg 480
tgccagcagc cgcggttaata cagaggtgac aagcgttaat 520
cggaattact gggcgtaaaag cgcgcgtagg tggtttgta 560
agttagatgt gaaagccccc ggctcaacct gggaactgca 600

```

```

ttcaaaactg acaagctaga gtatggtaga gggtggtgga 640
atttctctgt tagcgtgaa atgcgtagat ataggaagga 680
acaccagtgg cgaagcgac caccctgact gatactgaca 720
ctgaggtgag aaagcgtggg gacaaacag gattagatac 760
cctggtagtc cagcgcgtaa acgatgtcaa ctgcccgttg 800
ggagccttga gctcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt 840
tgaccgcctg gggagtagcg ccgcaaggtt aaaactcaaa 880
tgaattgacg ggggcccga caagcgtgg agcatgtggt 920
ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac 960
atccaatgaa ctttcagag atggatgggt gccttcggga 1000
acattgagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt 1040
cgtgagatgt tgggttaagt cccgtaacga gcgcaacct 1080
tgtcttagt taccagcagc taatggtggg cactctaagg 1120
agactgcggg tgacaaaccg gaggaggtg gggatgacgt 1160
caagtcacga tggcccttac gccctgggtc acacacgtgc 1200
tacaatggtc ggtacagagg gttgccaagc cgcgaggtgg 1240
agctaattccc acaaaaccga tcgtagtcgc gatcgagtc 1280
tgcaactcga ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgc 1320
gaatcagaat gtcgcgtga atacgtccc gggccttgta 1360
cacaccgccc gtcacacccat gggagtggtg tgcaccagaa 1400
gtagctagtc taaccttcgg gaggacggtt accacggtgt 1440
gattcatgac tgggtgaag tcgtaccaag gtgcccgtag 1480
gggaacctgc ggctggatca c 1501

```

【図面の簡単な説明】

【図1】シュードモナス ジェッセンイ P161株 (Pseudomonas jessenii P161; FERM P-17445) の16S rRNAの塩基配列を示す。

【図1】

Pseudomonas jessenii P161; FERM P-17445 の16S rRNA配列

TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTC
CTGAATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAC
AACGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCT
TCGGGCCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGG
CTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTG
AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA
AGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAA
GTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTGTTTGACGTTACCGACAGAATAAG
CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGG
GCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGGA
ATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCCTTGAGCTCT
TAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACCTTCCAGAGATGGATGGGT
GCCCTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGT
GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGT
TGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTC
TGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGT
GAATACGTCCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTCACC
AGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGG
GTGAAGTCGTACCAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC

フロントページの続き

(72)発明者 須田 栄
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(72)発明者 矢野 哲哉
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内
Fターム(参考) 4B064 AD83 CA02 CC03 CD07 DA16